

Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е.И. Шишацкая

«_____» _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Роль моноцитов-макрофагов в патогенезе атеросклероза сосудов сердца.

Научный руководитель _____ Профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник _____ О.Н. Бауман

Красноярск 2019

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1.Этиология и патогенез атеросклероза	5-9
1.2Морфологическая-функциональная характеристика моноцитов.....	10-12
1.2.1.Анализ подмножеств моноцитов.....	13-17
1.3. Моноциты-макрофаги и их роль в развитии атеросклероза	18-20
1.4. Способы коррекции гиперлипидемии.....	21
1.4.1. Фармацевтические препараты.....	21-22
1.4.2. Методы хирургического лечения атеросклероза.....	22-23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1. Объект исследования.....	24
2.2. Метод выделения моноцитов основан на центрифугировании лейкоцитов в гипертоническом градиенте плотности фиколл-урографина (Recalde H., 1984)	25-28
2.3 Культура Мн-Мф.....	28
2.4. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	28-29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	30
3.1. Образцы бионанопленок из ПГА.....	30-32
3.2. Морфологические типы моноцитов.....	33-39
ВЫВОДЫ	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41-43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	44-45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	46-50

ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь коронарных артерий – это одна из лидирующих причин смертности во всем мире. Лечение данного заболевания на сегодняшний день подразумевает применение вмешательств 2-х разновидностей – ЧТКА (чрезкожная транслюминальная коронарная ангиопластика) и АКШ (аорто-коронарного шунтирования) при наличии показаний и неэффективности консервативной терапии. Использование стентов с лекарственным покрытием, вместо металлических стентов без покрытия при ЧТКА позволило увеличить продолжительность жизни пациентов с обструктивными формами этого заболевания и значительно снизить риск развития острых тромбозов стентов после проведения процедуры стентирования, однако сохраняется риск развития повторных сужений стентированных сосудов.(Taniwaki M, 2015; Zhang B.C., 2015).

Показано, что на поверхности стента формируется эндотелий с многочисленными структурно-функциональными дефектами: нарушения структуры щелевых контактов, что определяет снижение барьерной функции, синтеза провоспалительных цитокинов, высокая адгезивность для моноцитов и тромбоцитов. Все эти события имеют место и в процессе развития «нативного» атеросклероза. В зоне стента скорость неоатеросклероза резко возрастает. Наноструктура материала, контактирующего с клетками, влияет на их функциональное состояние и морфологию (обзоры Rai M, 2015; Sasidharan A, 2015; Randeria PS, 2015).

Стенты нового поколения на основе наноматериалов будут представлять из себя 3D-матрицу со сложным нанорельефом. Специфический нанорельеф позволит целенаправленно манипулировать клеточными реакциями в зоне стентирования, как рецепторным сигналингом, так и рецептор-независимым сигналингом. Это позволит реализовать быструю целлюризацию поверхности стента и сформировать эндотелиальный монослой без структурных и

функциональных дефектов, с низкой адгезивностью для моноцитов и тромбоцитов.

Поверхность стента будет открыта для контакта с другими типами клеток – моноцитами, тромбоцитами, эритроцитами. Поэтому важно, чтобы 3D-матрица не провоцировала активацию свободно-радикальных процессов, формирование провоспалительных фенотипов макрофагов, не индуцировала агрегацию тромбоцитов и патоморфологические изменения эритроцитов. Создание таких стентов требует изучения наноматериалов в модельных системах *invitro* с использованием клеточных культур эндотелиоцитов, моноцитов, тромбоцитов, эритроцитов.

Освоение новых материалов является одним из высокорейтинговых направлений критических технологий мирового уровня. В настоящее время широкое распространение приобретают биологические полимерные материалы, получаемые из возобновляемого сырья, источником которого служат биомасса растений или микроорганизмы.

ПГА - это класс биоразрушаемых, биосовместимых и термопластичных полимеров различного химического строения, не подверженных небιологическому гидролизу с варьируемыми свойствами (кристалличность, молекулярный вес, механическая прочность и др.) в зависимости от набора и соотношения мономеров [Volovaetal., 2013]. Разнообразие ПГА и возможность изготовления композитных материалов на их основе, с другими полимерами, выдвигает класс биополимеров в разряд наиболее перспективных материалов в XXI веке.

В работе будет проведен поиск подходов к разработке алгоритма скрининга нано-структурированных материалов, которые можно использовать для производства сосудистых имплантатов.

Мы планируем использовать клетки крови моноцитарного типа, полученные у пациентов с атеросклерозом, использовать в качестве маркерной системы для определения иммунного ответа организма больных сАС на непосредственный контакт с поверхностью нано-структурированных

материалов. Поиск молекулярных механизмов реагирования планируется проводить *invitro*, в условиях краткосрочной культуры моноцитов-макрофагов. Такой подход в будущем позволит адаптировать стенты к конкретным патофизиологическим условиям, которые характерны для развития атеросклероза, что поможет снизить риск ре-стенозов, и, таким образом, избежать развития фатальных и жизнеугрожающих осложнений. Предполагается, что сравнительный анализ позволит сформировать алгоритм скрининга наноматериалов для создания сосудистых стентов и алгоритм прогнозирования патофизиологических осложнений в зонестента(неоатеросклероз, стеноз, тромбоз).

Целью работы является изучить морфофункциональную активность моноцитов-макрофагов в патогенезе атеросклероза при прямом контакте с бионанопленками.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

Оценить характеристики морфофункциональных изменений моноцитарных клеток, при прямом контакте с бионанопленками.

Посмотреть изменения моноцитов-макрофагов на различных видах полимерных плёнках.

Изучить характерные изменения в соотношении популяций M1 и M2.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология и патогенез атеросклероза

Атеросклероз - это воспалительное заболевание, связанное с отложением липидов. Взаимодействие иммунных клеток с субэндотелиальными липопротеинами и последующее образование пенных клеток играют решающую роль(Maxfield F.E et al.,2015)[10].

Роль различных звеньев иммунитета в развитии различных поражений активно изучается. Были выявлены признаки хронической Т-клеточной активации, сопряженной с увеличением количества лимфоцитов, экспрессирующих ранние и поздние активационные антигены – рецептор к интерлейкину-2 (CD25), антигены главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), апоптотический маркер CD95/Fas. Получены факты, которые позволяют считать, что Т-клетки могут выступать инициаторами иммунного воспаления при атерогенезе в ответ на модифицированные липопротеиды низкой плотности, а их медиаторы – как растворимые, так и контактзависимые – играть решающую роль в формировании атеросклеротических бляшек. Уменьшение экспрессии HLA-DR и CD25 на клетках периферической крови, является отражением процессов, способствующих подавлению активации Т-лимфоцитов, дифференциации Т-хелперов 1-го типа, что в конечном итоге приводит к снижению воспалительного ответа. (Т.С. Запорожец и др.,2009) [11].

В результате исследования выявлены различия экспрессии гена скавенджер-рецептора CD36 в периферической крови и атеросклеротических бляшках у пациентов с мультифокальным атеросклерозом, экспрессия гена рецептора Экспрессия гена рецептора MSR1, кодирующего класс рецепторов — мусорщиков-макрофагов, была замечена только в атеросклеротических бляшках и отсутствовала в периферической крови у этих больных. Экспрессия гена скавенджер-рецептора CD68 была значительно выше в крови у пациентов с мультифокальным атеросклерозом независимо от степени выраженности

атеросклеротического процесс а. Наиболее высокие показатели SCARB2 наблюдались в группе с мультифокальным атеросклерозом, а наименее выраженные показатели — в группе с острым коронарным синдромом.(Н.З. Давлятшина и др.,2017) [12].

В развитии атеросклероза играют роль множество цитокиновых элементов (Luisetal. 2017). Цитокины продуцируются в ответ на воспалительные и другие стимулы различными клетками: Т-клетками, моноцитами, макрофагами, тромбоцитами, а также эндотелиальными клетками, ГМК и адипоцитами. Повышенная продукция провоспалительных цитокинов связана с прогрессированием заболевания и способствует развитию атеросклероза. Продуцируемые Т-клетками цитокины в течение многих лет были классифицированы в две группы: первый тип – продуцируемые Т-хелперами 1-го типа (Th1) и второй – Т-хелперами 2-готипа (Th2). Основной ролью цитокинов 1-го типа является их способность активировать макрофаги и Т-клетки, в то время как цитокины, продуцируемые Th2-клетками, стимулируют развитие гуморального иммунного ответа. (Ait-OufellaH. etal.,2011) [13] .

Интерлейкин (IL) -17 является провоспалительным цитокином с дифференциальным воздействием на врожденные иммунные клетки. Исследовано влияние IL-17 на дифференцировку макрофагов и образование и активацию пенных клеток в ответ на окисленный липопротеин низкой плотности (oxLDL). Человеческие моноциты обрабатывали IL-17, чтобы индуцировать дифференциацию макрофагов. В качестве контроля человеческие моноциты были дифференцированы в макрофаги M1 или M2 макрофаги .Впоследствии был проанализирован уровень экспрессии маркеров, таких как CD80, CD36 и Toll-подобные рецепторы (TLR), а также образование пенных клеток и цитокинов в M1, M2 и макрофагах, дифференцированных с IL-17 с или без oxLDL.Это исследование показывает, что дифференциация макрофагов с IL-17 не вызывает экспрессии маркеров или цитокинов,

характерных для M1 или M2, и эти макрофаги образуют несколько пенных клеток; однако выражение TLR увеличивается. Более того, эти макрофаги приобретают воспалительную способность, о чем свидетельствует экспрессия костимулирующих молекул и секреция провоспалительных цитокинов в ответ на oxLDL. Эти данные свидетельствуют о том, что активация макрофагов, дифференцированных с IL-17 oxLDL, способствует воспалительному процессу атеросклероза. (Luisetal. 2017)[14].

Интерлейкин-4 (IL-4) способствует дифференцировке Т-клеток в Th2 клетки, продуцирующие IL-4, IL-5 и IL-13. У мышей Ldlr–/– отсутствие гена, кодирующего IL-4, не оказывало существенного влияния на развитие заболевания. Некоторые исследования представили убедительные доказательства того, что IL-4 может, напротив, индуцировать развитие воспалительного процесса, усиливая экспрессию провоспалительных медиаторов – цитокинов, хемокинов, молекул адгезии. (LeeY.Wetal.,2000) [15].

В качестве противовоспалительного цитокина интерлейкин-37 (IL-37) оказывает определенное защитное действие против воспалительных и аутоиммунных заболеваний. IL-37 экспрессируется в пенных клетках атеросклеротических бляшек как в коронарной, так и в сонной артерии человека, что указывает на возможное участие IL-37 в патогенезе и прогрессировании атеросклероза. Вмешательство Ил-37 эффективно уменьшало отношение площади полости аорты / сосуда у атеросклеротических мышей, что указывает на тормозящую роль IL-37 в образовании атеросклеротических бляшек по сравнению с контрольной группой. При совместном применении с ox-LDL IL-37 ингибировал превращение в клетки M1 и облегчал дифференцирование в клетки M2, что подтверждается повышением в главном маркере клеток CD206. Результаты показывают, что IL-37 может модулировать реакцию макрофагов на липосомы и облегчают дифференциацию в отношении противовоспалительных клеток M2. Такие результаты были также подтверждены у атеросклеротических мышей, в которых эффективна

рекомбинантная инъекция белка IL-37 ингибирует образование атеросклероза. (Lietal.,2015)[16].

Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 (Лп-ФЛА2) – это новый биомаркер, специфичный в отношении сосудистого воспаления и информирующий о воспалении в атеросклеротической бляшке и степени стабильности бляшки. Повышенный уровень Лп-ФЛА2 в сыворотке крови указывает на наличие бляшки, склонной к разрыву, и является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе коронарного атеросклероза, инфаркта миокарда и инсульта. Лп-ФЛА2 локализуется в атеросклеротических бляшках, особенно в тех, которые имеют некротическое ядро. Лп-ФЛА2 гидролизует фосфолипиды на поверхности окисленных ЛПНП в субэндотелиальном пространстве. Гидролизу подвергается центральная эфирная связь фосфолипидов. (sn-2), в результате чего образуются окисленные жирные кислоты и лизофосфатидилхолин (лизоФХ), молекула которого способна производить целый ряд потенциально атерогенных эффектов, в числе которых привлечение моноцитов, повышение экспрессии молекул адгезии и угнетение производства эндотелиального оксида азота. Таким образом, в интиму привлекаются моноциты, дифференцирующиеся там в макрофаги, которые, в свою очередь, превращаются в пенистые клетки, наряду с этим моноциты в то же время продуцируют Лп-ФЛА2, локально увеличивая ее концентрацию. Уровень Лп-ФЛА2 в сыворотке обладает низкой биовариабельностью, а его повышение свидетельствует о наличии бляшки, склонной к разрыву. (Cobble et al.,2012) [17].

1.2. Морфологическая-функциональная характеристика моноцитов

Моноцит - крупная клетка в периферической крови (12 - 22 мкм). Моноциты имеют общую с гранулоцитами предшественницу (КОЕ – ГМ), а также предшественницу только моноцитарного ростка (КОЕ – М).

Моноциты после выхода из костного мозга циркулируют в кровотоке в течение 20 – 40 часов, затем уходят в ткани, где происходит их окончательная специализация. Выйдя из кровяного русла, они не возвращаются в циркуляцию. Поступившие из кровяного русла в ткани моноциты представляют собой макрофаги. В тканях длительность их жизни колеблется от нескольких месяцев до нескольких лет. Они фагоцитируют остатки собственных погибших клеток организма, а также пораженные вирусами и стареющие клетки, в том числе и форменные элементы крови; очищают очаг воспаления, подготавливая его для репарации («дворники организма»). Однако в крови *in vivo* они практически не осуществляют фагоцитарные функции. Кроме фагоцитоза, моноциты выполняют секреторную и синтетическую функцию. Они синтезируют и выделяют ряд «медиаторов» воспаления: интерлейкины (ИЛ-1, 73 ИЛ-6), интерферон- α , ФНО- α , факторы ангиогенеза, роста фибробластов, ряд прокоагулянтов, белков системы комплемента и других [1].

В настоящее время моноциты делят на два основных подкласса. Один подкласс это Ly-6Chigh (также называемые Gr-1hi) и CCR2+CX3CR1low. Другой подкласс Ly-6Clow (также называемые Gr-1lo) и CCR2 – CX3CR1high. Моноциты CCR2+CX3CR1low мышей соответствуют моноцитам CD14+CD16– человека, а моноциты CCR2CX3CR1high мышей соответствуют CD14+CD16+ моноцитам человека. Отмечено, что количество Ly-6Chigh моноцитов значительно увеличено у apoE-/- мышей с гиперхолестеринемией. При этом повышена выживаемость этих моноцитов и отсутствует их трансформация в Ly-6Clow моноциты. Экспериментальными работами было продемонстрировано, что у мышей CX3CL1-/- CCR2-/-ApoE-/- и CX3CR1-/-

CCL2-/-ApoE-/- (тройное нокаутирование) резко снижается количество моноцитов и значительно уменьшается размер атеросклеротического поражения. В процессе атеросклероза важную роль играет и хемотаксис Gr1-/Ly6Clow моноцитов, этот процесс в основном регулируется CCR5. Показано, что количество моноцитов данной подгруппы коррелирует с площадью атеросклеротического поражения у больных ИБС. CX3CR1 играет важную роль в адгезии к эндотелию Gr1-/Ly6Clow моноцитов мышей и CD16+ моноцитов человека. Активация рецепторов (CCR2) к MCP-1 не только стимулирует проникновение моноцитов в сосудистую стенку, но и способствует их выходу из костного мозга. Это подтверждается тем, что у мышей с CCR2-/- значительно снижено общее количество моноцитов (Нозадзе и др., 2012) [2].

Популяция моноцитов состоит из различных подмножеств с различными маркерами поверхности клеток и функциональными характеристиками, и эта гетерогенность может иметь отношение к ангиогенным процессам при атеросклерозе. Показано, что моноциты, важные члены врожденной иммунной системы играют сложную роль в ангиогенезе. Изучение гетерогенности моноцитов является сложной задачей, поскольку разные субпопуляции этих клеток, определенные экспрессией определенных маркеров, не полностью перекрываются у мышей и людей. В обоих организмах циркулирующие моноциты можно разделить на несколько различных типов, основанных на экспрессии поверхностных молекул и хемокиновых рецепторов. У людей моноциты, положительные для CD14 и отрицательные для поверхностных антигенов CD16, являются наиболее распространенными и называются классическими моноцитами[3].

Фенотип макрофагов, формирующийся при действии внутриклеточных микробов и/или IFN- γ , получил название «классический» или M1 фенотип. Фенотип макрофагов, формирующийся при действии экстраклеточных паразитов и/или IL-4 и IL-13, получил название «альтернативный» или M2

фенотип. Таким образом, в зависимости от природы патогенного микроорганизма уже на этапе врожденного иммунного ответа происходит адаптивное альтернативное изменение/программирование фенотипа макрофагов. M1 клетки интегрированы в Th1 клеточный ответ, направленный на инактивацию бактерий, вирусов и опухолевых клеток. M2 макрофаги интегрированы в Th2 ответ, направленный на инактивацию экстраклеточных паразитов. M2 клетки регулируют активность воспалительной реакции, способствуют ремоделированию и репарации тканей, поврежденных при воспалении, ангиогенезу и опухолевому росту [4].

1.2.1. Анализ подмножеств моноцитов

В прошлом моноциты крови анализировали с помощью микроскопии окрашенных предметных стекол или их светорассеивающие свойства в гематологических анализаторах. Эти подходы не подходят для анализа подмножества моноцитов. Проточная цитометрия стала стандартным методом анализа моноцитов подмножеств, так как он обеспечивает возможность одновременного анализа нескольких поверхностных маркеров. После открытия нескольких подмножеств моноцитов CD14 и CD16 появились стандартные маркеры для определения популяций моноцитов.[23]

Выделяют несколько подмножеств моноцитов человека в соответствии с размером, гранулярностью, экспрессией HLA-DR и экспрессией CD14 и CD16 дало три подмножества: классическое подмножество (CD14 ++ CD16 -), промежуточное подмножество (CD14 ++ CD16 +) и неклассическое подмножество (CD14 dimCD16 ++).

Существование трех подмножеств моноцитов: CD14 ++ CD16- или «классический» (Mon 1), CD14 ++ CD16 + или «Промежуточные» (Mon 2) и CD14 + CD16 ++ или «неклассические» (Mon 3) подмножества, для CD14 ++ CD16 + популяция. Термин «промежуточное» подмножество моноцитов основан на их экспрессии CD16 и не полностью отражает их развитие, функциональные или общие фенотипические характеристики. На самом деле это Подмножество имеет наивысшую, а не промежуточную экспрессию большинства ключевых маркеров моноцитов.[36]

Разницу между Mon2 и Mon3 в фенотипе, функции, экспрессии генов и реакции на различные патологические состояния. Mon2 больше и гранулированнее, чем Mon3, и у них более высокая экспрессия рецепторы, включая те, которые вовлечены в воспаление (например, Toll-подобный рецептор 4 [TLR4], CCR5, CD11b, HLA-DR, рецептор интерлейкина-6 [IL-6], интегрин $\beta 2$). Mon2 имеют высшее выражение многих из этих рецепторы среди

всех подмножеств моноцитов. В отличие от этого, Mon3 имеют более высокую экспрессию интегрин $\alpha 4$, SLAN, CX3CR1, сиалофорин, CD294. Функциональные исследования показали, что Mon2 обладает более высокой антигенпрезентирующей способностью. Mon2 по сравнению с Mon3 также имеют более высокую фагоцитарную активность, более высокую продукцию фактор некроза опухоли (TNF) $-\alpha$, IL-6 и IL-1 β в ответ на липополисахарид (LPS) и более высокий уровень агрегации с тромбоцитами. Кроме того, сообщалось, что Mon2 сильные продуценты IL-10 и демонстрируют высокую способность поглощать апоптотические клетки, подобные Mon3.[37]

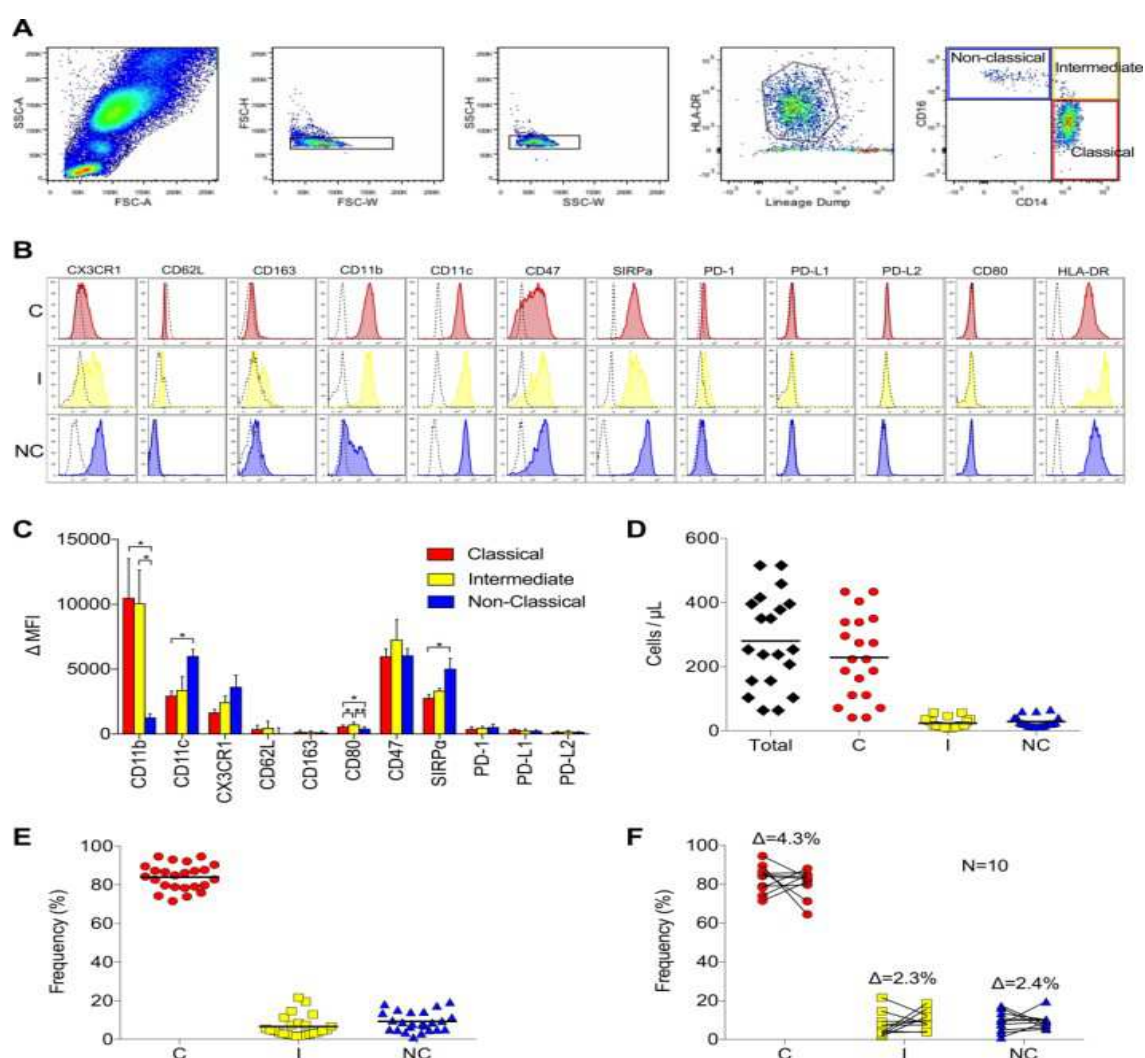


Рисунок 1. Фенотипирование моноцитов показывает строго контролируемое распределение подмножеств.

(А) Стратегия стробирования для фенотипирования подмножеств моноцитов человека, включая (слева направо) дискриминацию по размеру, дублетное исключение, отбор HLA-DR + lin -клетки и разделение в соответствии с экспрессией CD14 и CD16. (В) Репрезентативные гистограммы маркеров клеточной поверхности на подмножествах моноцитов от одного из 25 здоровых фенотипированных субъектов (С = классический, I = промежуточный, NC = неклассический). Классические моноциты (красный), промежуточные моноциты (желтый) и неклассические моноциты (синий) показаны с наложением на отрицательный контроль (пунктир). (С) Среднее выражение (\pm SD) поверхностных маркеров у всех субъектов, фенотипированных. (D) Абсолютное количество общих (черных), классических (красных), промежуточных (желтых) и неклассических моноцитов (синих) в обращении (столбец = среднее значение). (Е) Частота каждого поднабора в процентах от общего количества циркулирующих моноцитов. (F) Изменение частоты каждого подмножества у каждого из 10 субъектов, повторно фенотипированных через 4–6 месяцев после первоначального фенотипирования. Среднее изменение частоты (Δ) каждого подмножества показано.

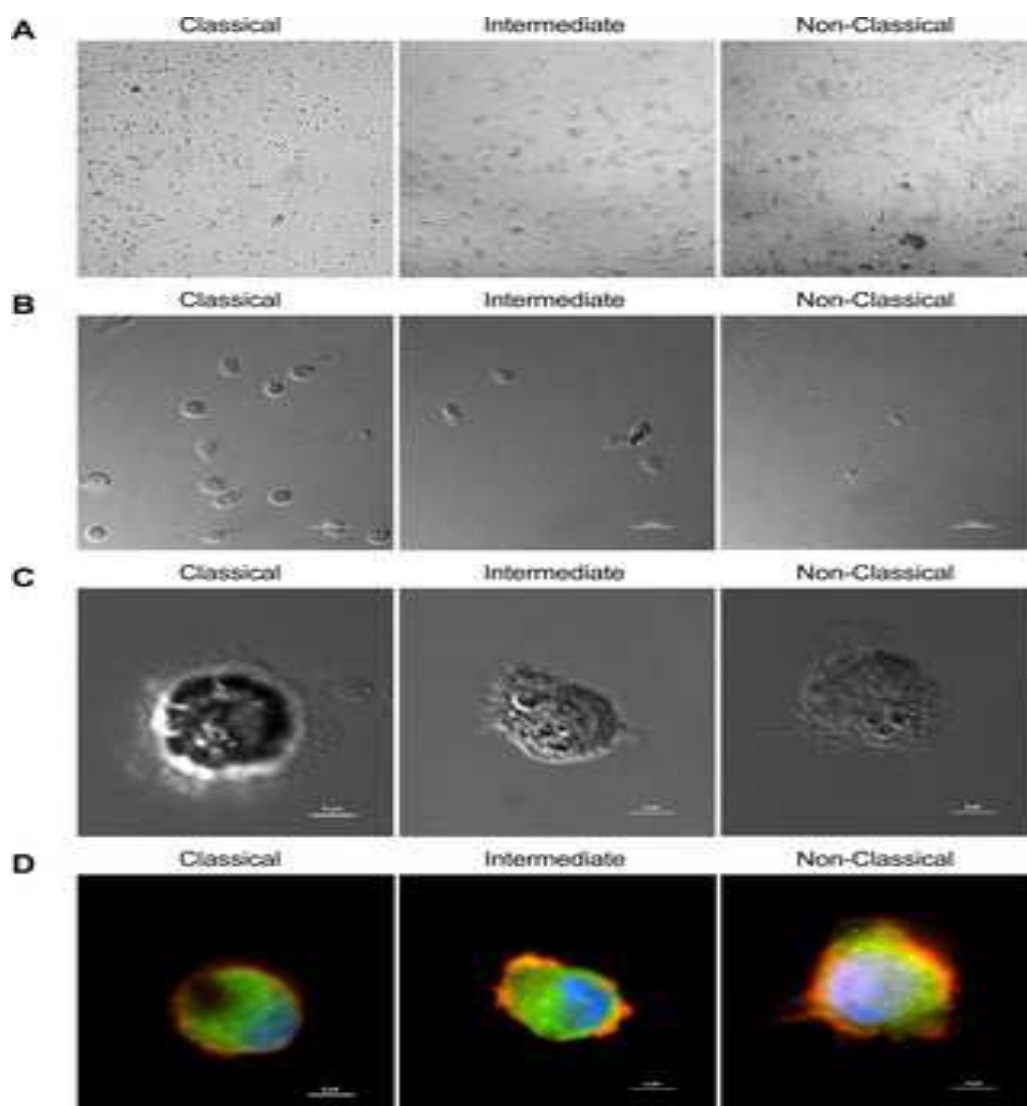


Рисунок 2. Морфология отсортированных подмножеств моноцитов.

(А) Низкое увеличение подмножеств моноцитов после магнитного обогащения и высокоскоростная сортировка из концентратов лейкоцитов (микрофотографии, сделанные при 10-кратном увеличении). (В) Дифференциально-интерференционно-контрастное (DIC) изображение подмножеств моноцитов после двухдневного культивирования и прилипания к субстрату при небольшом увеличении (верхняя панель) и большом увеличении (нижняя панель). (С) Флуоресцентное изображение клеток, показанное на нижней панели В, с окрашенными актином (оранжевым), винкулином(зеленым), β -тубулином (зеленым) и ядром (синим), чтобы показать морфологические признаки.

После магнитного обогащения и высокоскоростной сортировки из концентратов лейкоцитов все подгруппы моноцитов выглядели как маленькие, круглые, гомогенные клеточные популяции с помощью светлоразливной микроскопии. После двух дней культивирования на пластике в полной среде без добавленных факторов роста классические моноциты хорошо прилипали и, по-видимому, размножались. Неклассические моноциты были меньше, чем другие подмножества, и начали умирать, при этом несколько придерживались и демонстрировали раннее превращение в морфологию макрофагов, о чем свидетельствуют специфические для макрофагов морфологические особенности. Промежуточное подмножество отображало поведение между классическим и неклассическим подмножествами.[38]

1.2. Моноциты-макрофаги и их роль в развитии атеросклероза

Атеросклероз можно рассматривать как хроническое воспалительное состояние, в котором макрофаги играют разные и важные роли[5].

Атеросклероз — заболевание артерий, характеризующееся уменьшением их просвета, в результате уплотнения и утончения стенки артерий, уменьшения эластичности стенки артерий, появления холестериновых бляшек и т. д. [7]

Воспаление сосудов играет важную роль в патофизиологии атеросклероза. Как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы важны для инициирования и прогрессирования атеросклероза, которые в основном состоят из моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Кроме того, воспалительные биомаркеры, такие как высокочувствительный С-реактивный белок и интерлейкин-6, прогнозируют будущие сердечно-сосудистые события. Воспалительные механизмы атеросклероза привели к изучению новых терапевтических подходов. Различные биомаркеры воспаления могут предсказать будущих сердечно-сосудистых событий не только у пациентов с ССЗ, но также у здоровых людей. (Junji Moriya, 2018)

Макрофаги при атеросклеротических поражениях активно участвуют в приеме и накоплении липопротеинов, что приводит к образованию пенистых клеток атеросклеротических бляшек, заполненных липидными каплями. Накопление пенистых клеток способствует накоплению липидов в бляшке и ее росту. Макрофаги, населяющие атеросклеротическую бляшку, имеют уменьшенную способность мигрировать, что приводит к воспалению и к дальнейшему прогрессированию атеросклероза [6].

Развитие атеросклероза сопровождается процессами, характерными для хронического воспаления, вызывая поражение интимы крупных артерий.

Иммуногистохимические исследования пораженной артерии человека позволяют предположить, что интегрины моноцитов VLA-4 и LFA-1 и их соответствующие лиганды эндотелиальных клеток, VCAM-1 и ICAM-1, могут играть важную роль в процессах раннего атерогенеза(Никифоров Н.Г. и др.,2012)[7].

Наиболее распространенными животными моделями для изучения развития атеросклероза являются мыши с генетическим нокаутом по гену аполипопротеина E (ApoE^{-/-}) или же по гену , кодирующему рецептор для LDL (Ldlr^{-/-}).Мыши, дефицитные по ApoE-лиганд, связывающему липопротеины, подвержены спонтанному развитию атеросклероза, усугубляющегося при содержании их на диете с высоким уровнем жира. В то же время у мышей Ldlr^{-/-} атеросклероз индуцируется только диетой с высоким содержанием жира. В данной модели отсутствие LDL в гепатоцитах, является необходимым условием для развития атеросклероза. Это дает дополнительные преимущества при исследованиях атеросклероза на моделях и позволяет проводить исследования с пересадкой костного мозга из других нокаутных моделей. (Фатхуллина А.Р и др.,2016)[8].

Модели трансгенных мышей позволили непосредственно исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе развития атеросклероза. Во время патогенеза атеросклероза моноциты крови вводятся в интиму и субинтиму. На ранних стадиях процесса моноциты дифференцируются в пенные клетки для образования ранних бляшек, называемые жировыми полосками, в интиме. Начальные сосудистые жировые отложения созревают в атеросклеротические бляшки после накопления воспалительных клеток и внеклеточных липидов с формированием характерной морфологии – средней части бляшки, состоящей из липидов, холестерина, и окружающих ее гладкомышечных клеток и внеклеточного вещества, богатого коллагеном. Разработка атеросклеротических моделей с использованием репортерных мышей, в которых легко обнаруживаются подмножества моноцитов, а также методы визуализации с

высоким разрешением (такие, как прижизненная или неинвазивная визуализация), необходимы для изучения роли различных подмножеств моноцитов на разных этапах развития заболевания, от раннего атерогенеза до образования уязвимой бляшки до разрыва бляшки и тромбоза. (Кевин Дж и др., 2010)[9].

При развитии атеросклероза провоспалительные макрофаги M1 участвуют в иницировании образования и прогрессировании роста бляшек, в то время как противовоспалительные макрофаги M2 участвуют в стабилизации бляшек. Моноциты, выделенные из крови здоровых субъектов и пациентов, страдающих атеросклерозом, могут накапливать липиды при инкубации с атерогенным ЛПНП, и могут быть использованы для создания моделей на основе клеток для оценки потенциальных антиатеросклеротических веществ в разработке фармацевтических препаратов[5].

Использование аналогичной тест-системы, использующей моноциты больных САС для оценки влияния материалов, из которых впоследствии будут сделаны сосудистые импланты, на молекулярно-клеточные процессы, позволит разработать универсальные материалы для реставрации дефектов органов сердечно-сосудистой системы, сформировавшихся при атеросклерозе.[17]

1.4. Способы коррекции гиперлипидемии

1.4.1. Фармацевтические препараты

Проводятся исследования различных терапевтических агентов, которые способны ингибировать образование пенных клеток, и снижать вероятность заболевания атеросклерозом посредством различных эффектов.[24]

Статины: Симвастатин (Simvastatinum), Аторвастатин (Atorvastatinum), Правастатин (Pravastatinum), Розувастатин (Rosuvastatinum) и др. Ингибируют действие 3-гидроксиметилглутарил КоА-редуктазы, таким образом снижают синтез холестерина в печени. На животных моделях (мыши, крысы, кролики, морские свинки, свиньи) с гиперхолестеринемией действие препаратов привело к уменьшению уровня холестерина в плазме крови, замедлению развития атеромы, подавлению миграции макрофагов в зону интимы сосуда. Многочисленные исследования подтвердили эффективность препаратов при длительном использовании для уменьшения риска сердечнососудистых заболеваний и снижения уровня холестерина в плазме крови. Статины применяются в качестве средств вторичной профилактики. (ЛЕОНОВА Е.Н и др.,2017)

Метотрексат (Methotrexate).Нарушает синтез активных форм фолиевой кислоты, связываясь с ферментом дегидрофолатредуктазой.На кроликах с гиперхолестеринемией действие препарата привело к замедлению развития атеромы и миграции макрофагов в зону интимы сосуда.Предварительные испытания подтвердили уменьшение риска сердечно-сосудистых заболеваний. [7]

Ацетилсалициловая кислота (Аспирин).Ингибирует действие циклооксигеназ, нарушает метаболизм арахидоновой кислоты.На моделях животных с гиперхолестеринемией действие препарата привело к снижению пролиферации клеток гладкой мускулатуры и накоплению макрофагов в зоне

поражения сосуда, предотвращению рестеноза, а также замедлению развития атеромы и процесса образования тромбов. Многочисленные исследования выявили уменьшение риска сердечно-сосудистых заболеваний, уменьшение образования тромбов и понижение давления при длительном использовании Аспирина. (ЛЕОНОВА Е.Н и др., 2017)

1.4.2. Методы хирургического лечения атеросклероза

На сегодняшний день АКШ - один из наиболее эффективных, вместе с тем сложных и дорогостоящих методов лечения ИБС. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, нельзя не учитывать отрицательных последствий стандартной операции АКШ в условиях искусственного кровообращения (ИК), среди которых следует выделить негативное воздействие глобальной ишемии и кардиopleгии на миокард, неблагоприятное влияние ИК на функцию печени, почек, легких, центральной нервной системы. [8]

Процедуры эндоваскулярного протезирования являются одними из эффективных способов радикального устранения симптомов ишемии миокарда. В настоящее время многососудистое поражение и осложненная морфология сосуда не являются препятствием к проведению ЧКВ. Идеальным решением проблем рестенирования и развития других осложнений после ЧТКА является разработка полностью биоразрушаемых стентов. Коронарные стенты из нержавеющей стали (SS) продолжают представлять риск рестеноза стента, который влияет на его долгосрочную безопасность и эффективность. Разрабатываются стенты использованием оксида титана (TiO_2) на основе нанотрубок с помощью гидротермической обработки, что обеспечит улучшенную производительность стента *in vivo*. [9]

Требуются создание таких материалов для стентов, при которых при которых будет максимально снижен риск появления рестеноза. Следовательно, существует потребность в разработке биоактивных композиций для стентов,

для ингибирования образования пенных клеток. Используются очень разные подходы в разработке материалов и композиций для сосудистых имплантатов для оптимизации реакций организма при атеросклерозе. Проводится разработка различных полимеров на основе феруловой кислоты и промежуточных продуктов дикислоты в наночастицы, которые являются эффективными в качестве атерозащитных агентов против различных концентраций окисленного белка низкой плотности (оксЛПНП) в макрофагах.[10]

В области разработки современных наноматериалов вопрос «умного» материала для применения в интервенционной кардиологии, а именно производства графтов, стентов и покрытий для них, является чрезвычайно актуальным. Решение задач по разработке нано-структурного биоразрушаемого каркаса для сосудистых имплантатов позволит избавиться от большого количества осложнений при вмешательствах такого рода и значительно улучшить прогноз и качество жизни пациентов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Биологический материал:

Образцы биологического материала получали у пациентов обоего пола в возрасте до 60-65 лет, кровь пациентов с АС и ИБС. Получение биологического материала проводилось путем забора двух порций крови – 9 мл и 5 мл – утром натощак путем пункции локтевой вены, в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Образцы транспортировались в Лабораторию Биотехнологии Новых материалов СФУ, для дальнейшего анализа, функциональных фенотипов моноцитов и исследования особенностей формирования функциональных фенотипов макрофагов в контакте с разрабатываемыми био-наноматериалами.

Исследования проводились с разрешения Комитета по этике Кардиологического центра с соглашением, подписанным теми, кто принимал участие в исследованиях.

Образец исследования:

Были использованы полимерные пленки из ПГА:

Образец 1 Р (ЗНВ), 1 - поли3гидроксibuтират

Образец 2 Р (ЗНВ / 3 НВ / ЗННх) 2 - поли3гидроксibuтират
3гидроксивалерат 4 гидроксibuтират 3гидроксигексаноат.

Полигидроксиалканоаты (ПГА, англоязычная аббревиатура – PHA) обладают многими свойствами, которые являются привлекательными для биомедицинских сфер применения. (ПГА) - полимеры гидроксипроизводных карбоновых кислот. Эти биополимеры, наряду с полилактидами и полигликолидами, являются лидирующими полимерными материалами, активно изучаемыми в настоящее время. ПГА – это класс биоразрушаемых, биосовместимых и термопластичных полимеров различного химического

строения, не подверженных небιологическому гидролизу с варьируемыми свойствами (кристалличность, молекулярный вес, механическая прочность и др.) в зависимости от набора и соотношения мономеров [Volovaetal., 2013].

ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов); сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO₂ и H₂, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;

2.2 Метод выделения моноцитов основан на центрифугировании лейкоцитов в гипертоническом градиенте плотности фиколл-урографина (Recalde H., 1984)

1. Кровь (20мл) собираем в пробирку с ЭДТА.

(Концентрация ЭДТА 1,5—2,2 мг/мл крови. ЭДТА растворяют в 300-500 мкл 0,9% NaCl.)

В наших экспериментах:

40мг ЭДТА/ 1мл 0,9% NaCl/ 20мл крови.

10 мг ЭДТА/ 0,25 мл физ р-ра / 5 мл крови

2. Кровь центрифугируем 3000 об/мин, 15 мин.

3. Собираем плазму над пленкой лейкомассы.

Плазму центрифугируем 4500об/мин, 15мин, для осаждения тромбоцитов.

4. После отбора плазмы собираем лейкоцитарную пленку и суспендируем в плазме (после осаждения тромбоцитов), конечный объем суспензии 10мл.

5. К полученной суспензии трехкратно добавляют 9%NaCl по следующей схеме:

- 0 мин - добавляем 9% NaCl из расчета 5 мкл на 1 мл лейкомассы (50мкл), инкубация 10 мин при 37 °С;
- 11-я минута – добавляем 9% NaCl из расчета 10 мкл на 1 мл лейкомассы (100мкл), инкубация 10 мин при 37° С;
- 21-я минута – добавляем 9% NaCl из расчета 10 мкл на 1 мл лейкомассы (100мкл), инкубация 10 мин при 37 °С.

Общее время инкубации - 30 мин.

6. После завершения инкубации к лейкомассе добавляем равный объем фосфатного буфера (PBS). В PBS предварительно внести 9% раствор NaCl (25 мкл 9% раствора NaCl на каждый мл PBS, = 250 мкл на 10мл PBS).

7. Немедленно проводим выделение моноцитов на гипертономическом градиенте плотности фиколл-верографин (удельная плотность 1,080 г/см³). В пробирки на один объем гипертономического градиента осторожно наслаиваем 3 объема подготовленной лейкомассы.

6. Пробирки центрифугируем при 400 g, 15 мин при комнатной температуре в центрифуге с горизонтальным ротором (2100об/мин). После центрифугирования моноциты концентрируются в интерфазном кольце.

7. Моноциты из интерфазы переносим в пробирки и дважды промываем PBS. Режим центрифугирования – 3000об/мин, 15мин.

8. Клетки ресуспендируем в полной среде DMEM.

Все процедуры выделения проводим в стерильных условиях с использованием стерильных реактивов.

Количество моноцитов определяем подсчетом в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оцениваем с помощью 0,1% раствора трипанового синего.

Для выделения моноцитов нам нужно научиться приготавливать гипертонический градиент плотности фиколл-верографин.

Приготовление гипертонического градиента плотности фиколл-верографин.

Подготовка фиколла: 4.32 г (8.64) г порошка фиколл-400 растворить в 48 мл (96) мл дистиллированной воды.

Подготовка раствора рентгеноконтрастного вещества (в частности, урографина): 10.14 мл (20.28) мл 76% раствора верографина (урографина) доводят дистиллированной водой до 21мл (42) мл.

Смешиваем 48 мл раствора фиколла-400 и 21 мл раствора урографина, плотность полученного раствора 1,078 г/см³.

Если плотность выше, чем необходимо, добавляем раствор фиколла-400, если ниже – раствор верографина.

Для получения гипертонического градиента в стандартный раствор фиколл-урографина (удельная плотность 1,078 г/см³) добавляем кристаллический NaCl из расчета 2,8 мг на каждый миллилитр раствора фиколл-урографина.

Конечная плотность раствора составляет 1,080 г/см³.

При отсутствии фиколл-400 градиент плотности можно приготовить только из одного рентгено-контрастного вещества. С этой целью 10 (20) мл 76% раствора верографина смешать с 43.1 (86.2) мл дистиллированной воды и добавить 0.45 (0.9) мл. фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Полученный при этом

14.3% раствор верографина имеет плотность 1.077 г/см и может быть использован в качестве градиента плотности.

2.3. Культура МН-МФ

В культуральные 96-луночные планшеты (Sigma-Aldrich (Merck), USA) на дно лунок помещали диски из биополимерных материалов различного состава, и, после экспозиции в полной среде в течение 30 минут, 100 мкл среды DMEM на лунку, добавляли 50 мкл клеточной суспензии, в каждой лунке 105 кл. Контролем служил культуральный пластик. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (Eppendorf (NBS), Germany) в течение 6 дней, на 6-е сутки собирали культуральные фильтраты, а клетки на подложках фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (Sigma-Aldrich (Merck), USA) для морфологического анализа.

2.3.Атомно-силовая микроскопия и электронная микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) представляет собой семейство методов исследования и модификации поверхности на наноуровне и является мощным современным исследовательским инструментом. В основе всех методик АСМ лежит взаимодействие атомарно-острого зонда с поверхностью образца. Атомно-силовой микроскоп зондирует поверхность тонкой иглой – зондом, длина которой, как правило, несколько микрометров и радиус закругления иглы порядка 10 нм. Зонд находится на свободном конце кантилевера. Силы взаимодействия между иглой и поверхностью образца заставляют иглу с кантилевером изгибаться. Специальный детектор регистрирует отклонение кантилевера при перемещении иглы вдоль поверхности образца. (Высоцкий С. А. и др., 2019).

Одной из важных биологических характеристик имплантатов является смачиваемость их поверхности полярными и неполярными жидкостями,

которая определяется величиной угла контакта. Комплексная оценка обоих помогает предсказать биосовместимость материала при прямом контакте с клетками. Шероховатость поверхности является наиболее важным параметром для имплантируемых биоматериалов, определяющим адгезию, распространение и двигательную активность клеток, биосинтез специфических белков и механохимическую передачу сигналов.

Характеристики поверхности пленок оценивали с использованием прибора для измерения контактных углов смачиваемости DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows; контактные углы воды измерялись в автоматическом режиме; видеокادر капли обрабатывался в полуавтоматическом режиме после его стабилизации методом «Круг», встроенным в программный пакет. Энергия свободной поверхности, полярная составляющая ($\text{мН} / \text{м}$) рассчитывалась по методу Оуэнса-Вендта-Рабеля-Кельбея с использованием полученных значений контактных углов воды. Микроструктуру поверхности бионаноплёнки исследовали на сканирующем электронном микроскопе. Образцы размером 5×5 мм предварительно помещали и напыляли платиной с использованием Emitech K575X (Quorum Technologies Limited, Великобритания); SEM изображения были получены с использованием TM 3000 (Hitachi, Япония). Шероховатость поверхностей определяли с помощью атомно-силовой микроскопии в полуконтактном режиме марка. Среднее (R_a) и среднеквадратичное значение шероховатости (R_q) рассчитывали в 10 точках как среднее арифметическое от абсолютных значений отклонений высоты 5 самых высоких и 5 самых глубоких точек от средней линии профиля, используя стандартные уравнения (параметры шероховатости с таким же названием, ISO 4287/1). Срезы размером 20×20 мкм исследовали, затем срезы 2×2 мкм локальных максимумов и минимумов отбирали и повторно анализировали с более высоким разрешением, шероховатость для каждого образца рассчитывали для трех срезов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста выпускной квалификационной работы изъятые результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС – атеросклеоз

ИБС-шемическая болезнь сердца

ЛПОНП -Липопотеины очень низкой плотности

ЛП – Липопотеины

ИБС – ишемическая болезнь сердца

АС – атеросклероз

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ЧТКА - чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика

DES - Drug-elutingstent, стентов с лекарственным покрытием

BMS - Barmetalstent, металлических стентов без покрытия

ЛПНП – липопотеины низкой плотности

ЛПНП – липопотеины высокой плотности

КОЕ–ГМ - колониестимулирующая единица гранулоцитарно-
мотноцитарная

КОЕ – М - колониестимулирующая единица моноцитарна

ОУНТ -однослойные углеродные нанотрубки

DWCNT- двухслойные углеродные нанотрубки

НАЕС -нормальных эндотелиальных клеток аорты человека

ЧКВ - Чрескожные коронарные вмешательства

СЛП – стент с лекарственным покрытием

oxLDL-Окисленный липопротеин низкой плотности

SiNPs -наночастица кремнезема

БНМ-bio-mimeticnanostructuredscaffolds

ПЭТ-полиэтилентерефталата

TLIR-Toll –подобные рецепторы

SS-нержавеющая сталь

ИК- искусственное кровообращение

ЕРС-эндотелиальные клетки предшественники

НАЕС-эндотелиальные клетки аорты человека

ЛП-ФЛА2-липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2

Лизо-Фх- лизофосфатизил холин

Sn-2 – эфирная связь фосфолипидов

МЯ – многоядерные МН-МФ (округлые)

МН-МФ – одноядерные (округлые)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Адамбаева Н.К. Атеросклероз / Н.К. Адамбаева, Г.Э. Шерматов, А.О. Бобажонов // Научные достижения и открытия современной молодёжи. – 2018. – С. 243-245.
- 2 Давлятшина Н.З. Особенности экспрессии генов скавенджер-рецепторов моноцитов и макрофагов при разных клинических формах атеросклероза / Н.З. Давлятшина, С.Д. Маянская, А.Р. Мухаметгалиева // Вестник современной клинической медицины. – 2017. – Том. 10. – № 2. – С. 13-17.
- 3 Запорожец Т.С. Роль Т-клеточной дисфункции в развитии атеросклероза сосудов нижних конечностей и возможности её коррекции / Т.С. Запорожец // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 110-115.
- 4 Леонова Е.Н. Лекарственные средства для лечения атеросклероза: проблемы и перспективы, связанные с их разработкой / Е.И. Леонова, О.В. Галзитская / RussianScientist. – 2017. – т.1. – № 1. – С.47-67.
- 5 Леонова Е.В. Патофизиология системы крови : учеб.пособие / Е.В. Леонова, А.В. Чантурия, Ф.И. Висмонт. – Минск : БГМУ, 2009. – 53 с.
- 6 Лямина С.В. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 5). – С. 930-935.
- 7 Никифоров Н.Г. Макрофаги и метаболизм липопротеидов в атеросклеротическом поражении / Н.Г. Никифоров, А.Н. Грачев // Патологическая физиология. – 2012. – Том 10. – № 9. – С. 900-922.

8 Нозадзе Д.Н. Моноциты в развитии и дестабилизации атеросклеротической бляшки / Д.Н. Нозадзе, А.В. Рвачева, Е.И. Казначеева, И.В. Сергиенко // Атеросклероз и дислипидемии. – 2012. – № 3. – С. 25-32.

9 Сабирова Э.Ю. Аортокоронарное шунтирование в лечении больных ишемической болезнью сердца. Современное состояние вопроса / Е.Н. Чичерина, А.М. Эпштейн, Э.Ю. Сабирова, Е.Н. Чичерина, А.М. Эпштейн // Кировская государственная медицинская академия: УДК, 2010. – 108 с.

10 Фатхуллина А.Р. Роль цитокинов в развитии атеросклероза / А.Р. Фатхуллина, Ю.О. Пешкова, Е.К. Кольцова // БИОХИМИЯ. – 2016. – Том 81. – вып. 11. – С. 1614-1627.

11 Almeida C.R. Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation / Almeida C.R., Serra T, Oliveira M.I. // ActaBiomater. – 2014. – № 10. – P. 613-622.

12 Ait-Oufella H. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis / Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. – 2011. – № 4. – С. 969-979.

13 Bobryshev Y.V. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis / Y.V. Bobryshev, E.A. Ivanova, D.A. Chistiakov, N.G. Nikiforov, A.N. Orekhov // BioMed Research International. – 2016. – № 3. – 21-25.

14 Cobble M.E. Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза α 2: роль в развитии атеросклероза и пригодность для использования в качестве биомаркера риска сердечнососудистых заболеваний / K.J. Colley, R.L. Wolfert, M.E. Cobble // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – № 3. – С. 30-39.

15 Catapano A.L. Рекомендации ЕОК/ЕОА по диагностике и лечению дислипидемии / A.L. Catapano // Российский кардиологический журнал. – 2017. – № 5. – С. 7-77.

16 Chhour Peter. Labeling Monocytes with Gold Nanoparticles to Track Their Recruitment in Atherosclerosis with Computed Tomography / Chhour Peter et

al // *Biomaterials* 87 (2016): PMC. – Web. 5. – Apr. 2018. – P. 93-103.

17 Cobble M.E. Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза 2: роль в развитии атеросклероза и пригодность для использования в качестве биомаркера риска сердечнососудистых заболеваний // K.J. Colley, R.L. Wolfert, M.E. Cobble // *Атеросклероз и дислипидемии*. – 2011. – № 3. – С. 30-39.

18 Catapano A.L. Рекомендации ЕОК/ЕОА по диагностике и лечению дислипидемии / A.L. Catapano // *Российский кардиологический журнал*. – 2017. – № 5. – С. 7-77.

19 Delgado L.M. To cross-link or not to cross-link. Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices / Delgado L.M., Bayon Y, Pandit A. // *Tissue Eng Part B Rev*. – 2015. – № 2. – P. 298-313.

20 Grotenhuis N. In vitro model to study the biomaterial-dependent reaction of macrophages in an inflammatory environment / Grotenhuis N, Vd Toom HFE, Kops N. // *Br J Surg*. – 2014. – №10. – P. 983-992.

21 Jones J.A. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells / Jones J.A., Chang D.T., Meyerson H. // *J Biomed Mater Res A*. – 2007. – № 8. – P. 585-596.

22 Joana Viola. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation / Joana Viola, Oliver Soehnlein // *Seminars in Immunology*. – 2015. – Volume 27. – Issue 3. – P. 184-193.

23 Jaipersad A.S. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis / A.S. Jaipersad, BA, Gregory Y.H., S. Silverman, E. Shantsila // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2014. – Vol. 63. – Issue 1. – P. 1-14.

24 Junji Moriya. Critical roles of inflammation in atherosclerosis / Junji Moriya // *Journal of Cardiology*. – 2018. – № 5. – P. 1-6.

25 Jaipersad A.S. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis / A.S. Jaipersad, BA, Gregory Y.H., S. Silverman, E. Shantsila // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2014. – Vol. 63. – Issue 1. – P. 1-

14.

26 Kevin J. Woollard Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions / Kevin J., Woollard Frederic Geissmann // *Nature Reviews Cardiology*. – 2010. – № 7. – P. 77-86.

27 Kita T. Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via augmenting a regulatory T-cell response in mice / Kita T. // *Cardiovasc. Res.* – 2014. – 102. – P. 107-117.

28 Luis Chavez-Sanchez. IL-17-differentiated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein / Luis Chavez-Sanchez // *Lipids in Health and Disease*. – 2017. – № 3. – P. 16-19.

29 Lee Y.W. IL-4 induces apoptosis of endothelial cells through the caspase-3-dependent pathway / Y.W Lee, H. Kuhn, B. Hennig, M. Toborek // *FEBS Letters*. – 2000. – № 11. – Vol. 485. – P. 122-126.

30 Li Z.L. Protective effect of the polarity of macrophages regulated by IL-37 on atherosclerosis / J. Huang, F.L. Hou, A.Y. Zhang¹ and Z.L. Li // *Genetics and Molecular Research*. – 2015. – №15. – P. 31-33.

31 Lisa B. Boyette. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets / Lisa B. Boyette, Camila Macedo, Kevin Hadi, Beth D. Elinoff, John T. Walters, Bala Ramaswami, Geetha Chalasani, Juan M. Taboas, Fadi G. Lakkis, Diana M. Metes. – 2017. – № 1. – P. 29-33.

32 McGovern N. Human dermal CD14(+) cells are a transient population of monocyte-derived macrophages / N. McGovern, A. Schlitzer, M. Gunawan, L. Jardine, A. Shin, E. Poyner, K. Green, R. Dickinson, X.N. Wang, D. Low, K. Best, S. Covins, P. Milne, S. Pagan, P.S. Wasan, K. Duan, M. Poidinger, V. Bigley, F. Ginhoux, M. Collin, M. Haniffa // *Immunity*. – 2013. – № 4. – P. 59-64.

33 Maxfield F.E. Monocyte-Derived Dendritic Cells Upregulate Extracellular Catabolism of Aggregated Low-Density Lipoprotein on Maturation, Leading to Foam Cell Formation / F.R. Maxfield // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. – № 10. – P. 2092-2103.

34 Mohan Chandini C. Stable Titania Nanostructures on Stainless Steel

Coronary Stent Surface for Enhanced Corrosion Resistance and Endothelialization
Advanced Healthcare Materials / Mohan Chandini C., Cherian Aleena Mary,
KurupSujis / Adv. Healthcare Mater. – 2017. – № 11. – P. 14-17.

35 Mikolajczyk T.P. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells / Mikolajczyk T.P., Skrzeczynska-Moncznik J.E., Zarebski M.A., Marewicz E.A., Wisniewska A.M., Dzieba M, Dobrucki J.W., Pryjma J.R. // Immunology. – 2009. – № 2. – P. 103-113.

36 Passlick B. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood / Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H.W. : Blood, 1989. – 127 p.

37 Patel A.A. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation / A.A. Patel, Y. Zhang, J.N. Fullerton, L. Boelen, A. Rongvaux, A.A. Maini, V. Bigley, R.A. Flavell, D.W. Gilroy, B. Asquith, D. Macallan, S. Yona // J. Exp. Med. – 2017. – № 7. – P. 1913-1923.

38 Reed A.M. Biodegradable elastomeric biomaterials polyethylene oxide, polyethylene terephthalate copolymers / Reed A.M., Gilding D.K., Wilson J. // Trans Am Soc Artif Intern Organs. – 1977. – № 3. – P. 109–115.

39 Rebecca A. Chmielowski. Athero-inflammatory nanotherapeutics: Ferulic acid-based poly (anhydride-ester) nanoparticles attenuate foam cell formation by regulating macrophage lipogenesis and reactive oxygen species generation / Rebecca A. Chmielowski // Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. – 2017. – P. 1742-1761.

40 Yin Dou. Non-proinflammatory and responsive nanoplateforms for targeted / Yin Dou.

41 Yin Dou. Treatment of atherosclerosis // Yin Dou, Yue Chen, Xiangjun Zhang, Xiaoqiu Xu // Biomaterials. – 2017. – P. 93-108.

42 Yuka Suzuki. Single and double-walled carbon nanotubes enhance atherosclerogenesis by promoting monocyte adhesion to endothelial cells and

endothelial progenitor cell dysfunction / Yuka Suzuki, Saeko Tada-Oikawa, Yasuhiko Hayashi / Suzuki et al // Particle and Fibre Toxicology. – 2016. – P. 1-11.

43 Jaipersad A.S. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis / A.S. Jaipersad, BA, Gregory Y. H., S. Silverman, E. Shantsila // Journal of the American College of Cardiology. -2014.-Vol. 63, Issue 1, 7-14, 1-11 p.

Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 Заведующий кафедрой
Е.И. Шишацкая

« 6 » июня 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Роль моноцитов-макрофагов в патогенезе атеросклероза сосудов сердца.

Научный руководитель  Профессор, д.б.н. Е.И. Шишацкая

Выпускник  О.Н. Бауман

Красноярск 2019